

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-304782

(43)Date of publication of application : 05.11.1999

(51)Int.CI.

G01N 30/34  
G01N 30/88

(21)Application number : 10-115329

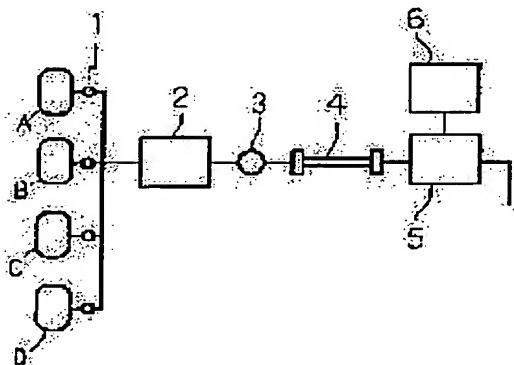
(71)Applicant : SEKISUI CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 24.04.1998

(72)Inventor : SHIMADA KAZUHIKO  
KAWABE TOSHIKI  
OISHI KAZUYUKI**(54) METHOD FOR SEPARATING SAMPLE BY LIQUID CHROMATOGRAPH****(57)Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To make a peak of each component sufficiently sharp and measure in a short time without adversely influencing separation, by feeding an eluate by a gradient elution method or step elution method, and lowering an elution power of the eluate in the halfway.

**SOLUTION:** This method is useful for separating and determining a saccharified hemoglobin or the like requiring a short-time analysis. A column filled with a cation exchange filler is used for the separation and determination. An eluate is fed in a range of a salt concentration of 20–1000 mM, pH4–9 by a gradient elution method or step elution method. The salt concentration of the eluate is lowered to a range of 5–100 mM, pH 0.1–1 in the halfway, thereby decreasing an elution force of the eluate to separate a sample. Eluates A, B, C, D have different elution forces and can be adapted to be switched at a set time by a solenoid valve 1. The eluate is introduced by a feed pump 2 together with the sample introduced from a sample injection part 3 to a column 4, where each component is detected by a detector 5. Each peak is calculated by an integrator 6.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 28.09.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-304782

(43)公開日 平成11年(1999)11月5日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
G 0 1 N 30/34  
30/88

識別記号

F I  
G 0 1 N 30/34  
30/88

E  
Q

審査請求 未請求 請求項の数1 OL (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平10-115329

(22)出願日 平成10年(1998)4月24日

(71)出願人 000002174  
積水化学工業株式会社  
大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号  
(72)発明者 鶴田 一彦  
山口県新南陽市開成町4560 積水化学工業  
株式会社内  
(72)発明者 川辺 俊樹  
山口県新南陽市開成町4560 積水化学工業  
株式会社内  
(72)発明者 大石 和之  
山口県新南陽市開成町4560 積水化学工業  
株式会社内

(54)【発明の名称】 液体クロマトグラフによる試料の分離方法

(57)【要約】

【課題】 液体クロマトグラフによる試料の分離に際して、勾配溶出法または段階溶出法で溶離液を送液する場合において、各成分ピークを十分鋭くし、かつ分離に悪影響を与えず短時間で測定できる分離方法を提供する。

【解決手段】 液体クロマトグラフによる試料の分離に際して、溶離液を勾配溶出法または段階溶出法によって送液させ、その途中において溶離液の溶出力を低下させることを特徴とする液体クロマトグラフによる試料の分離方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 液体クロマトグラフによる試料の分離に際して、溶離液を勾配溶出法または段階溶出法によって送液させ、その途中において溶離液の溶出力を低下させることを特徴とする液体クロマトグラフによる試料の分離方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、液体クロマトグラフによる試料の分離方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 液体クロマトグラフを用いて試料を分離する場合、溶離液として一定の溶出力のものを一種類用いる方法の他に、各成分のピークを鋭くし、分離度を改善したり、測定時間を短縮したりするなどの目的のために、溶離液を勾配溶出法または段階溶出法によって送液することが一般的に行われている。

【0003】 勾配溶出法は、グラジエント溶離法とも言われ、溶離液の溶出力を弱いものから強いものへと時間的に直線的に上昇させる方法(図1参照)であり、送液ポンプを複数台用いて、溶出力の異なる液を送液し、その比率を連続的に変化させることにより、全体的な溶出力を変化させる方法である。

【0004】 段階溶出法は、ステップワイズ溶離法とも言われ、溶離液の溶出力を段階的に上昇させる方法(図2参照)であり、送液ポンプ1台を用い、送液ポンプの上流側で電磁弁等により溶出力の異なる液を切り替え、段階的に溶出力を変化させる方法である。

【0005】 これらの場合において、溶離液の溶出力を変化させるには、例えば、溶離液の極性、イオン強度、pHなどが挙げられる。(以上の従来の技術については、日本分析化学会関東支部編、高速液体クロマトグラフィーハンドブック、39~40頁、117~119頁、1985年)。

【0006】 しかしながら、各成分の性質が類似している場合、短時間で溶出することが要求されていたりする場合、勾配溶出法で勾配が大きすぎたり、段階溶出法で溶出力を上げすぎたりすると、類似した性質の成分間でピークが重なり、分離に悪影響を及ぼす恐れがある。そこで、このような場合、ピークが重なるポイントで勾配を緩めたり、全くなくしたり、溶出力の上昇の程度を低くしたりしている。しかし、このような対策ではピークの鋭さがなくなり、また、測定時間が延びたりするなど、勾配溶出法または段階溶出法の利点が發揮されないことがあった。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明はこのような問題点に着目してなされたもので、本発明の目的は液体クロマトグラフによる試料の分離に際して、勾配溶出法または段階溶出法で溶離液を送液する場合において、各成

分ピークを十分鋭くし、かつ分離に悪影響を与える短時間で測定できる分離方法を提供することにある。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明は、液体クロマトグラフによる試料の分離に際して、溶離液を勾配溶出法または段階溶出法によって送液させ、その途中において溶離液の溶出力を低下させることを特徴とする液体クロマトグラフによる試料の分離方法である。

## 【0009】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明に

おいて、溶出力が低い溶離液とはピークの保持時間を遅くするような溶離液のことを言い、溶出力が高い溶離液とはピークの保持時間を早くするような溶離液のことを言う。溶離液の溶出力を低下させるには、例えば、陽イオン交換クロマトグラフィーでは、溶離液の塩濃度を下げる方法、pHを下げる方法などが挙げられ、陰イオン交換クロマトグラフィーでは、溶離液の塩濃度を下げる方法、pHを上げる方法などが挙げられ、逆相クロマトグラフィーでは、溶離液の有機溶媒の極性を上げる方法、順相クロマトグラフィーでは、溶離液の有機溶媒の極性を下げる方法が挙げられる。

【0010】 陽イオン交換液体クロマトグラフィーの充填剤としては、シリカ系または有機高分子系等の基材に、官能基としてカルボキシル基またはスルホン酸基等を導入したものが使用できる。陰イオン交換液体クロマトグラフィーの充填剤としては、シリカ系または有機高分子系等の基材に、官能基として第3級アミノ基または第4級アンモニウム基等を導入したものが使用できる。イオン交換液体クロマトグラフィーの緩衝液としては、リン酸、クエン酸、タル酸、ホウ酸、炭酸系等のもの他、2-(N-モリホリノ)エタンスルホン酸(MES)、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPES)、ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン(Bis-Tris)等のGoddの緩衝液も使用できる。

【0011】 逆相クロマトグラフィーの充填剤としては、シリカ系または有機高分子系等の基材に、官能基としてオクタデシル基、オクチル基、フェニル基等を導入したものが使用できる。溶離液の溶媒としては、水、アセトニトリル、メタノール、エタノール等、一般に逆相クロマトグラフィーに使用されてきた溶媒のいずれも使用できる。順相クロマトグラフィーの充填剤としては、シリカゲル、アルミナ等が使用できる。溶離液の溶媒としては、ベンゼン、トルエン、キシレン、ヘキサン等、一般に順相クロマトグラフィーに使用されてきた溶媒のいずれも使用できる。

【0012】 本発明の方法の利用分野としては、特に限定されないが、短時間での分析が要求される医療分野の分析(例えば、糖尿病の診断の指標とされる糖化ヘモグロビンなどの分離定量)に特に有用である。

【0013】本発明の方法を糖化ヘモグロビンの分離定量に用いる場合について以下述べる。糖化ヘモグロビンの分離定量には、陽イオン交換充填剤が充填されたカラムを用い、溶離液を塩濃度2.0～10.0mM、pH4～9の範囲で勾配溶出法または段階溶出法によって送液させ、その途中において溶離液の塩濃度を5～10.0mM、pHを0.1～1の範囲で下げることによって溶離液の溶出力を低下させて分離を行う。

【0014】本発明の方法を段階溶出法によって行う場合の、装置の構成例を図3に示した。溶離液A、B、C、Dは、各々溶出力の異なる（例えば、塩濃度、pH、極性などにおいて異なる）ものであり、電磁弁1によって設定時間に各溶離液に切り替えられるように構成されている。溶離液は、送液ポンプ2により、試料注入部3から導入された試料とともにカラム4に導かれ、各成分が検出器5により検出される。各ピークの面積、高さなどはインテグレータ6により算出される。

#### 【0015】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施例について説明する。

##### 実施例1

図3に示した装置を用いて、血液試料中のヘモグロビン類の分離定量を行った。カラムには陽イオン交換樹脂（ミクロネックスA1c HS-IV、積水化学工業社製）を充填したものを用いた。溶離液Aとして1.70mM、溶離液Bとして1.90mM、溶離液Cとして1.50mM、溶離液Dとして3.30mMの、それぞれリン酸緩衝液でpH6のものを用いた。試料としては、健常人から採血した血液を界面活性剤（トリトンX-100を0.01重量%含有するリン酸緩衝液、pH7）を用いて100倍に溶浴、希釈したもの用いた。2分間でヘモグロビンA1cピーク（後述のピークP5）を各ヘモグロビン類のピークから分離定量するように溶離液を段階溶出法を用いて切り替えた。溶離液の切り替え条件および得られたクロマトグラムを図4に示した。すなわち、溶離液は0～3.8秒は溶離液Aを、3.8～5.8秒は溶出力のより高い溶離液Bを、5.8～7.8秒はより溶出力の低い溶離液Cを、7.8～10.0秒は溶出力の最も高い溶離液Dを、10.0～12.0秒は溶離液Aを再び送液した。ピークの検出には415nmの吸収強度を用いた。

【0016】図4のクロマトグラムにおいて、ピークP1～P3は、ヘモグロビンA1a (HbA1a) 及びヘモグロビンA1b (HbA1b) 類であり、ピークP4はヘモグロビンF (HbF) であり、ピークP5はヘモグロビンA1c (HbA1c) であり、ピークP6はヘモグロビンA0 (HbA0) である。

【0017】上記の方法では、溶離液Aから溶離液Bへの切り替えにより溶出力を上昇させたことによりピークP6が早く溶出して、HbA1cのピークであるピーク

P5の正確な検出を妨害するのを防ぐため、溶離液Bから溶出力のより低い溶離液Cへの切り替えを行っている。

【0018】再現性をみるために、この方法で同一試料について10回繰り返し測定し、次式によりHbA1c濃度を算出した。10回の各測定値、その平均値および変動係数（単位%）（標準偏差÷平均値×100）を表1に示した。

$$HbA1c\text{濃度}(\%) = \frac{\text{ピークP5の面積} + (\text{ピークP1の面積} + \text{ピークP2の面積} + \text{ピークP3の面積} + \text{ピークP4の面積} + \text{ピークP5の面積} + \text{ピークP6の面積})}{\times 100}$$

#### 【0019】比較例1

実施例1における溶離液Cを用いなかった他は、実施例1に準じて実施例1と同一の試料中のヘモグロビン類の分離定量を行った。溶離液の切り替え条件および得られたクロマトグラムを図5に示した。すなわち、溶離液は0～3.8秒は溶離液Aを、3.8～7.8秒は溶出力のより高い溶離液Bを、7.8～10.0秒は溶出力の最も高い溶離液Dを、10.0～12.0秒は溶離液Aを再び送液した。溶離液Aから溶離液Bへの切り替えにより溶出力を上昇させたことが影響し、図5に○で囲んだように、ピークP6の一部が早く溶出し、ピークP5と重なっていることが分かる。再現性をみるために、この方法で同一試料について10回繰り返し測定し、実施例1と同様にしてHbA1c濃度を算出した。10回の各測定値、その平均値および変動係数を表1に示した。

#### 【0020】比較例2

実施例1における溶離液Cを用いなかったこと、および溶離液Bの代わりに溶離液B1（1.80mM、pH6のリン酸緩衝液）を用いた他は、実施例1に準じて実施例1と同一の試料中のヘモグロビン類の分離定量を行った。溶離液の切り替え条件および得られたクロマトグラムを図6に示した。すなわち、溶離液は0～3.8秒は溶離液Aを、3.8～7.8秒は溶離液B1を、7.8～10.0秒は溶出力の最も高い溶離液Dを、10.0～12.0秒は溶離液Aを再び送液した。比較例1に比較して、溶離液Aから溶離液Bよりも溶出力の低い溶離液B1へ切り替えたため、ピークP6の一部が早く溶出することはないが、ピークP5は鋭くはならず、図6に○で囲んだように、ピークP5にピークP4およびピークP6が一部重なっていることが分かる。再現性をみるために、この方法で同一試料について10回繰り返し測定し、実施例1と同様にしてHbA1c濃度を算出した。10回の各測定値、その平均値および変動係数を表1に示した。

#### 【0021】

【表1】

	実施例1	比較例1	比較例2
測定値 (%)	4. 5 5	4. 6 0	4. 2 8
	4. 5 8	4. 4 5	4. 5 8
	4. 5 8	4. 4 4	4. 3 3
	4. 5 8	4. 5 8	4. 3 6
	4. 5 2	4. 4 4	4. 6 0
	4. 5 6	4. 3 8	4. 5 2
	4. 5 5	4. 4 5	4. 5 5
	4. 5 2	4. 5 6	4. 3 2
	4. 5 3	4. 3 8	4. 4 5
	4. 5 5	4. 5 5	4. 6 0
平均値 (%)	4. 5 5	4. 4 8	4. 4 6
変動係数 (%)	0. 5	1. 8	2. 8

## 【0022】

【発明の効果】本発明に係る液体クロマトグラフによる試料の分離方法の構成は、上述の通りであり、本発明の方法を用いると、勾配溶出法または段階溶出法において、各成分ピークを十分鋭くでき、かつ各成分ピーク間

の分離も良好となる。その結果として再現性等の性能を向上できる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】勾配溶出法を説明するための説明図。

【図2】段階溶出法を説明するための説明図。

【図3】段階溶出法によって行う場合の、装置の構成例を示す図。

【図4】実施例1の溶離液の切り替え条件および得られたクロマトグラムを示す図。

10 【図5】比較例1の溶離液の切り替え条件および得られたクロマトグラムを示す図。

【図6】比較例2の溶離液の切り替え条件および得られたクロマトグラムを示す図。

## 【符号の説明】

1 電磁弁

2 送液ポンプ

3 試料注入部

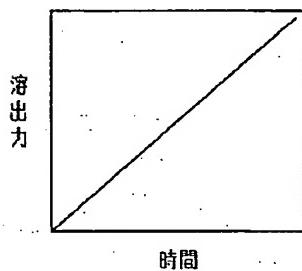
4 カラム

5 検出器

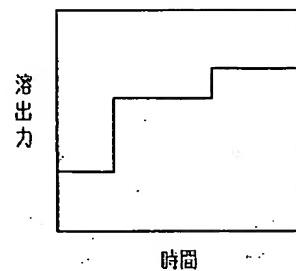
6 インテグレータ

A, B, B1, C, D 溶離液

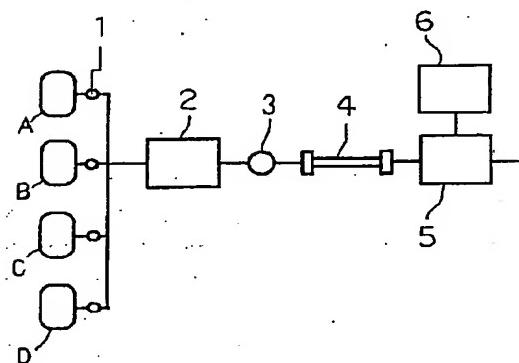
【図1】



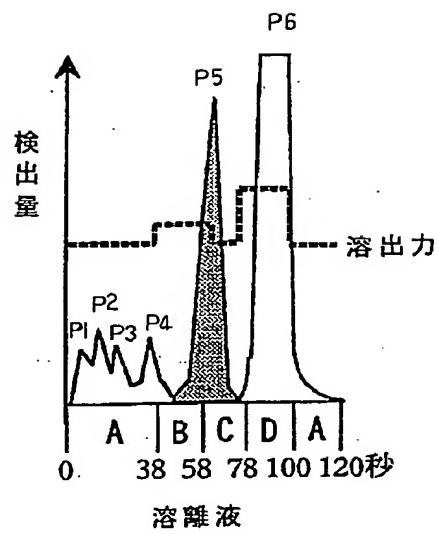
【図2】



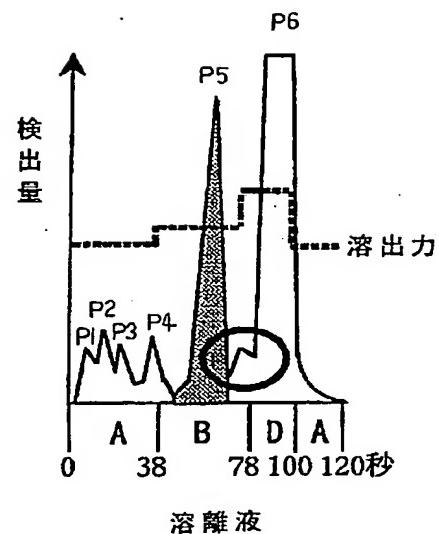
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】

